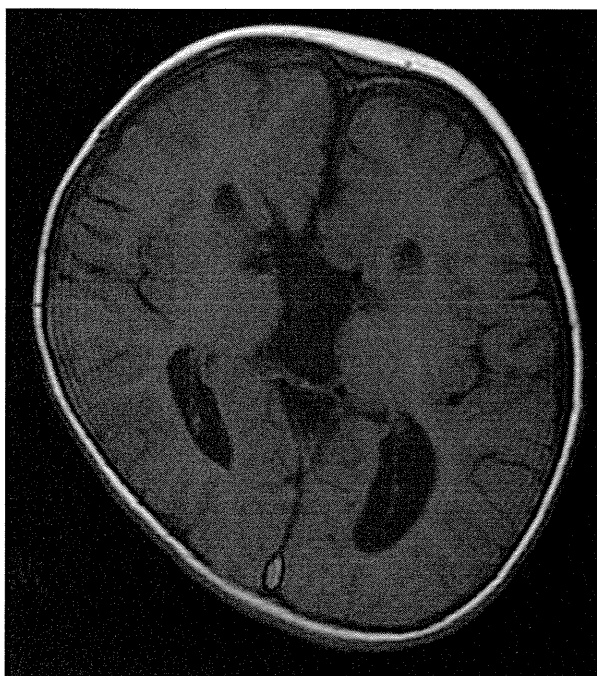


が、児の顔貌は Noonan 症候群の所見に合致した。CFC 症候群など、Noonan 症候群類縁疾患ではまれに脳梁低形成を合併することがあるが、脳梁欠損が最初に主要症状と判断された場合、Noonan 症候群を考えない可能性もある。標的遺伝子解析をうける機会がなければ診断に至らなかった可能性がある。

図1 Noonan 症候群 1 歳時の頭部 MRI である。完全型脳梁欠損とそれに伴う側脳室変形を認める。



2) 皮質形成異常症

症例は3歳女児。周産期に特記事項なし。頸定6ヶ月、座位1歳半で、現在も独歩不可である。有意語は単語数個程度で、重度精神運動発達遅滞を認める。眼瞼裂狭小、耳介低位、薄い上口唇など特徴的顔貌を認める。視聴覚に問題なし。体格は標準であった。頭部MRIで側脳室拡大、白質容量減少、前頭葉に有意な厚脳回を認めた。脳波では多焦点性の棘波を散見した。脳波異常はあるが、現時点ではてんかん発作は認めない。一般血液検査、G分染法、マイクロアレイ染色体検査では異常を認めなかった。標的遺伝子解析で *ACTB* 遺伝子変異を同定した。両親に変異はなく、Baraitser-Winter 症候群と診断した。

Baraitser-Winter 症候群は、精神運動発達遅滞を、特徴的顔貌（眼瞼下垂、眉毛がアーチ型眼間開離など）、眼底コロボーマ、脳回異常（厚脳回や滑脳症）、てんかんなど主要症状とする先天異常症候群である。責任遺伝子は、*ACTB* である。*ACTB* はマイクロフィラメントを構成する β

アクチンをコードする遺伝子である。マイクロフィラメントは、細胞骨格として、細胞の形の維持、変形、細胞内の物質移動などに関わる。*ACTB* 変異が Baraitser-Winter 症候群の症状を構成する機序はまだ十分解明されていない。

図2 Baraitser-Winter 症候群のMRI画像。前頭葉などに厚脳回症を認めた。白質容量減少、脳室拡大も伴う。



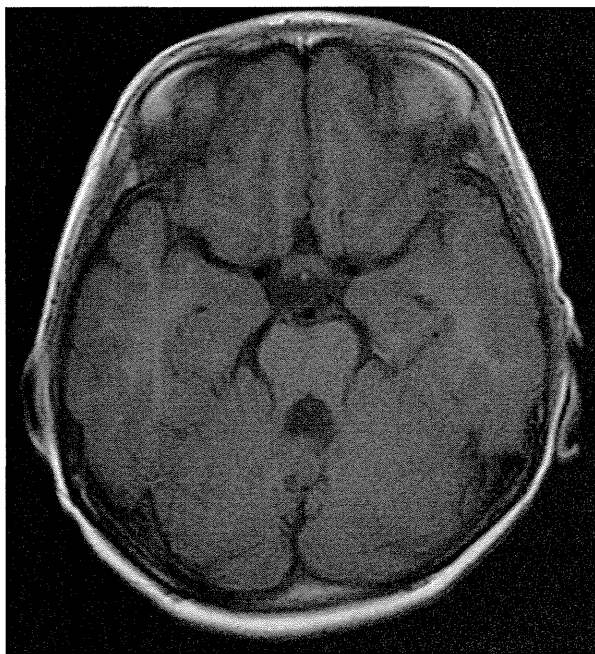
3) 小脳低形成

小脳低形成と重度精神運動発達遅滞男児例で *AHI1* 遺伝子のミスセンス変異をホモ接合で同定した。小脳虫部の低形成であり、Joubert 症候群3型と判明した。*AHI1* は繊毛の機能に重要な役割をもち、いわゆる ciliopathy の一種であり、臨床像と合致した。

Joubert 症候群は、特徴的な小脳と脳幹の形態異常 (Molar tooth sign)、筋緊張低下、運動失調、発達遅延、間欠的な過呼吸・無呼吸、非典型的な眼球運動の両方又はいずれかを有する。その他に、網膜ジストロフィー、腎疾患、眼コロボーマ、肝線維症、多指症、などがみられる。

今回は重度精神運動発達遅滞男児で *AHI1* 遺伝子のホモ接合変異を同定した。頭部MRIでは小脳虫部の低形成を認め、臨床像も合致した。

図3 Joubert症候群のMRI画像
小脳虫部低形成を認めた。



4) 小頭症

小頭症女児で、レット症候群様の手もみ動作のある小頭症症例において*FOXG1*遺伝子変異を同定した。この遺伝子は標的遺伝子に入っていなかったが、別途サンガー法で解析して診断した。

5) 大頭症

*DYRK1A*遺伝子変異を認めた。本遺伝子変異は通常小頭症であるが、本例の頭囲は大きかった。昨年の報告書に詳細を記載した

6) その他

重度精神運動発達遅滞、Angelman症候群様の脳波異常を呈する女児において、*GABRD* (神経伝達物質GABAの受容体の構成成分) の変異を同定した。

症例は12歳女児で、周産期に特に問題はなかった。乳児期より筋緊張低下、重度の発達遅滞を認めた。各種検査において原因不明であった。DQは10程度で最重度の精神運動発達遅滞であった。現在、座位保持、立位保持不能、有意語はなかった。レット症候群様の手もみ動作を認めた。脳波検査で後頭葉有意の両側性高振幅棘波徐波結合を認めた。体格はこがらで軽度の小頭症を認めたが、外表奇形はなかった。レット症候群やアンジェルマン症候群に対する各種解析は異常を見いだせなかった。

重度精神運動発達遅滞、Angelman症候群様の脳波異常を呈する女児において*GABRD*変異を同定した。病的意義は高いと考えられた。従来、*GABRD*遺伝子 はてんかん症例で報告されてい

るものであったが、レット症候群やアンジェルマン症候群と類似した症状を呈することがあることが示唆された。

全エクソーム解析

全エクソーム解析は14家系で実施し、現時点で全家系の解析が終了した。6家系で責任遺伝子が同定、あるいはかなり疑わしい変異が見いだされた。

(1) 小脳低形成男児1例で*HNRNPH2*

(heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H2) 遺伝子変異を同定した。小脳低形成責任遺伝子としてはまだ報告がなく、新規疾患遺伝子の可能性が考えられた。なお、*HNRNPH2*の関連遺伝子 はてんかんなど各種神経疾患との関連が報告されている。今後、基礎的な研究を進める予定である。

(2) 重度精神運動発達遅滞、皮膚弛緩症症例で*ALDH18A1*変異を同定した。この遺伝子は Δ 1-pyrroline-5-carboxylate synthase、P5C合成酵素をコードしており、低プロリン血症、低オルニチン血症、低シトルリン血症、低アルギニン血症、高アンモニア血症などの代謝異常に加えて、重度精神運動発達遅滞、関節過伸展(不安定性、皮膚過剰弾性、顕著な皮膚弛緩を呈する。臨床的にも合致した。

(3) 重度知的障害症例で*CREBBP*遺伝子変異を同定した。この遺伝子はRubinstein-Taybi症候群の責任遺伝子であり、特異顔貌が診断に重要である。本児はやや非典型的であったが、Rubinstein-Taybi症候群と診断された。

(4) 別の知的障害症例では*GRIN2A*の突然変異を認めた。*GRIN2A*は、Laundau-Kleffner症候群の責任遺伝子であり、てんかん性失語と関連する。本例ではてんかん発作はないが、脳波で棘波を認めた。有意語が獲得できておらず、遺伝子変異と脳波異常、言語機能の関連が示唆された。

(5) 原因不明の知的障害、てんかん、MRI白質病変の兄弟で、アミノ酸代謝に関わる新規遺伝子変異を複合型ヘテロ接合で同定した。別途報告予定である。

(6) 脳梁低形成、知的障害、視神経萎縮の男児例でRAS-MAPK系の新規遺伝子変異を同定した。病原性は強いが、基礎的実験で裏付けを行う予定である。

全エクソーム解析では他にも多くのde novo変異が同定されたが、疾病との関連が不明確なものについてはさらなる継続的な研究を予定している。

D. 考察

神経疾患と関連する284 遺伝子配列を網羅的に解析するシステムを構築し、昨年度から継続して神経疾患の解析を行った。標的解析40例全例で解析が終了した。他の方法を組み合わせることで、その中で標的遺伝子解析では13例で病因解明に至った。正確な診断のもとに今後の予後予測、注意すべき合併症の早期把握、治療方針決定や遺伝カウンセリングに有用な情報が得られた。

標的遺伝子解析の結果として、過去に報告されている典型例とは異なる所見を呈する例でも変異が同定されたことは注目に値する。*DYRK1A* 遺伝子変異は通常小頭症を呈するが、今回の症例は機能喪失変異であるのに、大頭であった。Baraitser-Winter症候群症例も顔貌の特徴は顕著でなく、最初から臨床診断で疑いを持つことは困難であった。Noonan症候群も脳梁欠損という稀な合併奇形が主要症状であった。このように非典型例や表現型の多様性を持つ疾患では、最初から候補遺伝子を絞ってサングー法で解析を行うことは困難な場合があり、次世代シーケンサーが有用と考えられた。

Joubert症候群は責任遺伝子が20異常あり、臨床所見からのみではどの遺伝子変異が原因であるか、推測は困難である。今回、AHI遺伝子変異を1例で同定した。多数の責任遺伝子が考えられる場合もサングー法では対応が困難であり、次世代シーケンサーを用いた解析は有用と考えられた。

全エクソーム解析では既報告のない遺伝子変異が複数同定され、新規症候群の可能性のある症例も存在した。遺伝子の機能解析などを検討している。

標的解析は多数の遺伝子解析を効率的に実施できるが、神経疾患の責任遺伝子は年々増加しており、全エクソーム解析の重要性が高まると考えられる。現時点で責任遺伝子の同定に至らなかった症例に対しては、さらに検討中である。

E. 結論

標的遺伝子解析および全エクソン解析により、従来の方法では病態解明が困難であった症例の一定数で結論が得られた。機能解析や類似症例の解析などを通じてさらに研究を進展させる方針である。

F. 研究発表

1. Okamoto N, Ohmachi K, Shimada S, Shimojima K, Yamamoto T. 109 kb deletion of chromosome 4p16.3 in a patient with mild

phenotype of Wolf-Hirschhorn syndrome. *Am J Med Genet A.* 161;1465-9, 2013

2. Okamoto N, Fujii T, Tanaka J, Saito K, Matsui T, Harada N. A clinical study of patients with pericentromeric deletion and duplication within 16p12.2-p11.2. *Am J Med Genet A.* 164;213-9, 2014
3. Ohba C, Okamoto N, Murakami Y, Suzuki Y, Tsurusaki Y, Nakashima M, Miyake N, Tanaka F, Kinoshita T, Matsumoto N, Saitsu H. PIGN mutations cause congenital anomalies, developmental delay, hypotonia, epilepsy, and progressive cerebellar atrophy. *Neurogenetics.* In press
4. Tsurusaki Y, Okamoto N, Ohashi H, Mizuno S, Matsumoto N, Makita Y, Fukuda M, Isidor B, Perrier J, Aggarwal S, Dalal A, Al-Kindy A, Liebelt J, Mowat D, Nakashima M, Saitsu H, Miyake N, Matsumoto N. Coffin-Siris syndrome is a SWI/SNF complex disorder. *Clin Genet.* In press
5. Wada T, Ban H, Matsufuji M, Okamoto N, Enomoto K, Kurosawa K, Aida N. Neuroradiologic Features in X-linked α -Thalassemia/Mental Retardation Syndrome. *Am J Neuroradiology*, 34;2034-8. 2013
6. Miyake N, Mizuno S, Okamoto N, Ohashi H, Shiina M, Ogata K, Tsurusaki Y, Nakashima M, Saitsu H, Niikawa N, Matsumoto N. KDM6A Point Mutations Cause Kabuki Syndrome. *Hum Mutat*, 34;108-10, 2013
7. Kosho T, Okamoto N, Ohashi H, Tsurusaki Y, Imai Y, Hibi-Ko Y, Kawame H, Homma T, Tanabe S, Kato M, Hiraki Y, Yamagata T, Yano S, Sakazume S, Ishii T, Nagai T, Ohta T, Niikawa N, Mizuno S, Kaname T, Naritomi K, Narumi Y, Wakui K, Fukushima Y, Miyatake S, Mizuguchi T, Saitsu H, Miyake N, Matsumoto N. Clinical correlations of mutations affecting six components of the SWI/SNF complex: Detailed description of 21 patients and a review of the literature. *Am J Med Genet A.* 161;1221-37. 2013
8. Miyatake S, Murakami A, Okamoto N, Sakamoto M, Miyake N, Saitsu H, Matsumoto N. A de novo deletion at 16q24.3 involving ANKRD11 in a Japanese patient with KBG syndrome. *Am J Med Genet A.* 161;1073-7, 2013
9. Shimada S, Okamoto N, Hirasawa K, Yoshii K, Tani Y, Sugawara M, Shimojima K, Osawa M, Yamamoto T. Clinical manifestations of

- Xq28 functional disomy involving MECP2 in one female and two male patients. *Am J Med Genet A.* 161;1779-85. 2013
10. Shimada S, Okamoto N, Nomura S, Fukui M, Shimakawa S, Sangu N, Shimojima K, Osawa M, Yamamoto T. Microdeletions of 5.5 Mb (4q13.2-q13.3) and 4.1 Mb (7p15.3-p21.1) associated with a saethre-chotzen-like phenotype, severe intellectual disability, and autism. *Am J Med Genet A.* 161;2078-83. 2013
 11. Shimada S, Okamoto N, Ito M, Arai Y, Momosaki K, Togawa M, Maegaki Y, Sugawara M, Shimojima K, Osawa M, Yamamoto T. MECP2 duplication syndrome in both genders. *Brain Dev.* 35;411-9, 2013
 12. Iida A, Okamoto N, Miyake N, Nishimura G, Minami S, Sugimoto T, Nakashima M, Tsurusaki Y, Saitsu H, Shiina M, Ogata K, Watanabe S, Ohashi H, Matsumoto N, Ikegawa S. Exome sequencing identifies a novel INPPL1 mutation in opsismodysplasia. *J Hum Genet.* 58;391-4,2013
 13. Miyake N, Mizuno S, Okamoto N, Ohashi H, Shiina M, Ogata K, Tsurusaki Y, Nakashima M, Saitsu H, Niikawa N, Matsumoto N. KDM6A Point Mutations Cause Kabuki Syndrome. *Hum Mut.* 34;108-10, 2013
 14. Aoki Y, Niihori T, Banjo T, Okamoto N, Mizuno S, Kurosawa K, Ogata T, Takada F, Yano M, Ando T, Hoshika T, Barnett C, Ohashi H, Kawame H, Hasegawa T, Okutani T, Nagashima T, Hasegawa S, Funayama R, Nagashima T, Nakayama K, Inoue S, Watanabe Y, Ogura T, Matsubara Y. Gain-of-function mutations in RIT1 cause Noonan syndrome, a RAS/MAPK pathway syndrome. *Am J Hum Genet.* 93;173-80, 2013

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし

厚生労働科学研究費補助金
難病・がん等の疾患分野の医療の実用化研究事業（難病関係研究分野）
分担研究報告書

東日本圏における患者情報収集（中枢神経奇形・奇形症候群）と遺伝子解析に関する
研究

研究分担者 加藤光広 山形大学医学部附属病院 小児科 講師

研究要旨：昨年度、次世代シーケンサーによる網羅的な標的候補遺伝子解析を行ったが、変異同定率が低かった。今年度、小頭症を中心とする脳形成異常16家系19例に対し、トリオ検体を用いて次世代シーケンサーによる全エクソーム解析を行った。13家系で1から9個の劣性もしくはde novo変異を同定した。臨床情報と併せ、6家系で既知の原因遺伝子と考えられる変異を同定した。トリオ検体を用いた全エクソーム解析は、標的候補遺伝子解析よりも変異同定率が高く、遺伝子座異質性の高い疾患もしくは多面効果のみられる遺伝子については臨床的にも有効な解析手法である。

A. 研究目的

脳形成異常は感染や中毒、血流障害などの環境要因によっても生じるが、近年は遺伝子解析技術の進歩により、たくさんの原因遺伝子が同定され、遺伝性要因の解明が著しい。頭部 MRI を用いた画像診断によって原因遺伝子の推定がなされるが、複数の原因遺伝子が同じ表現型を示す遺伝子座異質性をきたす疾患の報告が増えており、表現型から原因遺伝子を推定することは必ずしも容易ではない。特に、小頭症は遺伝子座異質性が顕著であり、DHPLC 法や HRM 法による変異スクリーニングや Sanger 法によるシーケンスは効率が悪い。また、一つの遺伝子が複数の表現型をきたす多面効果もしくは多面変異も報告が増加しており、表現型をもとにした候補遺伝子解析には限界が生じてきている。次世代シーケンサーは、網羅的なリシーケンシングが可能であり、上述の問題を解決できると推測される。

本研究では、遺伝子座異質性の著明な小頭症を中心とする脳形成異常の原因遺伝子同定のために、トリオ検体を用いて次世代シーケンサーによる全エクソーム解析を行った。

B. 研究方法

山形大学医学部小児科の脳形成障害データベースから脳形成異常が両側対称性で遺伝子異常が推測される 16 家系 19 例（小頭症 8 家系 10 例、脊髄性筋萎縮症を伴う滑脳症 1 例、多小脳回 2 家系 3 例、脳室周囲異所性灰白質 2 例、高 CK 血症を伴う皮質形成異常症 1 例、水頭症 1 例、脳梁欠損症 1 例）および脳室周囲異所性灰白質の 2 例を

除く両親 28 例（トリオ検体 14 家系）に対し、次世代シーケンサーを用いて全エクソーム解析を行った。小頭症 8 家系の分類は、真正小頭症 3 家系 4 例、橋小脳低形成を伴う同胞例 1 例、小滑脳症 3 家系 4 例、多小脳回の併発 1 例である。

次世代シーケンサーで確認された変異の一部は、Sanger 法によるシーケンスで確認した。（倫理面への配慮）

遺伝子解析は山形大学医学部倫理審査委員会の承認を受け行われた。

C. 研究結果

13 家系で 1 から 9 個の劣性もしくは de novo 変異が同定された。臨床情報を併せると、小頭症 2 家系で *ASPM* に複合ヘテロのナンセンス変異とフレームシフト変異、脳梁欠損症 1 例で *EPG5* に複合ヘテロのナンセンス変異、高 CK 血症を伴う皮質形成異常症の 1 例で *POMT2* にミスセンス変異とスプライシング部分の複合ヘテロ変異、水頭症の 1 例で *TUBA1A* に de novo のミスセンス変異、脊髄性筋萎縮症を伴う滑脳症の 1 例で *DYNC1H1* に de novo のミスセンス変異を同定し、それぞれ疾患原因遺伝子と考えられた。

D. 考察

全エクソーム解析を行い小頭症を中心とする脳形成異常16家系中6家系に疾患原因と考えられる変異を同定した。昨年まで行ったカスタムキャプチャー法では、同じ小頭症を主とする脳形成異常34家系中2家系しか疾患原因と考えられる変異が同定できておらず、トリオ検体を用いた全エクソーム解析の優位性が確認された。

脳梁欠損症で同定された *EPG5* はオートファジ

一に關与し、Vici症候群の原因遺伝子として報告された(Cullup et al. Nat Genet 2013)。Vici症候群は脳梁欠損以外に白内障、心筋症、免疫不全、低色素症をきたす全身性疾患である。現在他の併発症の有無について確認中であるが、遺伝子診断によって併発症の管理が適切に行われるようになり、遺伝相談以外の臨床面でも有用性が高いと考えられる。

*POMT2*は先天性筋ジストロフィーの一型であるWalker-Warburg症候群の原因遺伝子として当初報告された。その後脳形成異常を伴わない高CK血症と知的障害の症例、中枢神経系の異常を伴わない肢帯型筋ジストロフィーの症例でも*POMT2*変異が報告されており、表現型に幅がある。本症例は錐体路徴候を認めるが独歩が可能で、脳形成異常も皮質の一部に限られており、Walker-Warburg症候群や他の報告例には合致せず、臨床的に疑うことは困難であった。高CK血症のみが共通所見であるが、高CK血症を呈する疾患は数多く存在する。高CK血症に知的障害や脳形成異常を伴う症例はデュシャンヌ型筋ジストロフィーや福山型先天性筋ジストロフィーを除けば、比較的まれであり*POMT2*変異を疑う特徴になると考えられる。

*DYNC1H1*の変異も多面効果を示し、2011年に軸索型Charcot-Marie-Tooth病の1家系、2012年に優性遺伝性脊髄性筋萎縮症の3家系、厚脳回の2例が報告され、最近本症例と類似した皮質の形成異常と脊髄性筋萎縮症を伴う2例が報告されている(Fiorillo et al. Hum Mut 2014)。*DYNC1H1*は軸索輸送や細胞移動に關与するダイニンの重鎖をコードし、いずれの病態とも深く関わっていることが明らかである。

未知の遺伝子については、今後類似症例で変異の有無を確認し、疾患との関連性を明らかにする必要がある。

E. 結論

脳形成異常の原因遺伝子は多数存在し、遺伝型と表現型との関連性が強い疾患については候補遺伝子解析が有用だが、遺伝子座異質性の強い疾患もしくは多面効果のみられる遺伝子については、トリオ検体を用いた全エクソーム解析が有用である。

F. 研究発表

1. 論文発表

Toba S, Tamura Y, Kumamoto K, Yamada M, Takao K, Hattori S, Miyakawa T, Kataoka Y, Azuma M, Hayasaka K, Amamoto M, Tominaga K, Wynshaw-Boris A, Wanibuchi H, Oka Y, Sato M, Kato M, Hirotsune S. Post-natal treatment by a blood-brain-barrier permeable calpain inhibitor, SNJ1945 rescued defective function in

lissencephaly. Sci Rep (2013);3:1224

Yoneda Y, Haginoya K, Kato M, Osaka H, Yokochi K, Arai H, Kakita A, Yamamoto T, Otsuki Y, Shimizu S, Wada T, Koyama N, Mino Y, Kondo N, Takahashi S, Hirabayashi S, Takanashi J, Okumura A, Kumagai T, Hirai S, Nabetani M, Saitoh S, Hattori A, Yamasaki M, Kumakura A, Sugo Y, Nishiyama K, Miyatake S, Tsurusaki Y, Doi H, Miyake N, Matsumoto N, Saito H. Phenotypic spectrum of *COL4A1* mutations: porencephaly to schizencephaly. Ann Neurol (2013);73:48-57

加藤光広：【小児脳神経外科の課題】 脳形成異常と遺伝子 脳神経外科ジャーナル 22(4):252-255, 2013

加藤光広：【臨床医が知っておきたい先天異常】 遺伝子変異による先天異常 滑脳症(神経細胞移動異常症) 小児科臨床 66 巻増刊号 66(8):1333-1337, 2013

2. 学会発表

Mitsuhiro Kato: The genetic background of cortical dysplasias. 2013 Cortical Dysplasia Symposium, Children's Epilepsy Association of Taiwan. January 13, 2013, Tainan, Taiwan

加藤光広：大脳皮質形成異常とてんかんの分子病態. 新潟脳神経研究会特別例会：新潟 2013年4月16日

G. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む。)

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

厚生労働科学研究費補助金
難病・がん等の疾患分野の医療の実用化研究事業（難病関係研究分野）
分担研究報告書

眼先天異常の遺伝子診断に関する研究

研究分担者 仁科 幸子

独立行政法人 国立成育医療研究センター 感覚器・形態外科部 眼科医員

研究要旨

眼先天異常は小児の視覚障害原因の第1位を占め、多くは病因不明で有効な治療法が確立されていない。眼先天異常の内訳は多種多様であるが、全身疾患・奇形症候群に伴う比率が高い。

本研究では中枢神経系・感覚器が発生学的に頭部外胚葉という共通の由来を持ち、先天異常の発症に共通の遺伝子経路が関与する可能性が高いことに着目して、コンソーシアムを編成し、臨床データ・検体・次世代シーケンサー技術という研究リソースを全国規模で共有して遺伝要因の解明を目指している。そこで、すでに難聴と中枢神経奇形に対し成果を挙げている遺伝子変異解析パネルを、眼科領域にも応用するために、各種の遺伝子・遺伝子疾患のデータベースから眼科疾患関連遺伝子を抽出して、857遺伝子・1130疾患の対照表を作成した。

本リストを用い眼科領域でも効率よく遺伝子解析を行うことが可能となった。これを用いて、慶應義塾大学臨床遺伝学センターおよび国立成育医療研究センターに精査加療目的にて受診した小角膜・小眼球・先天白内障などの前眼部の眼先天異常患児、さらに視神経乳頭の先天異常、網膜硝子体変性症などの後眼部の眼先天異常患児に対しても、遺伝学的検索を進めている。また、さまざまな眼先天異常に対し、遺伝要因による病態の解明のため、新たな機器・評価法を導入して前眼部～後眼部の形態・機能について精密な解析を加えた。これらの研究の推進によって、眼先天異常に対し効率的な遺伝子診断が可能となり、病態解明と治療法の開発に寄与すると期待される。

A. 研究目的

眼先天異常は小児の視覚障害原因の第1位、約57%を占め、依然として病因不明で有効な治療法のない疾患が多い。眼先天異常の内訳は多種多様であるが、いずれも全身疾患・奇形症候群に伴う比率が高く、特に中枢神経系異常の検索が、病因診断のため必須となる。

本計画では中枢神経系・感覚器が発生学的に頭部外胚葉という共通の由来を持ち、先天異常の発症に共通の遺伝子経路が関与する可能性が高いことに着目して、コンソーシアムを編成し、臨床データ・検体・次世代シーケンサー技術という研究リソースを全国規模で共有して遺伝要因の解明を目指している。

これまでの研究で、難聴と中枢神経奇形の分野で、既知遺伝子群の変異解析を行うため解析パネルの設計と運用を開始している。感度・特異度とも極めて高く、既知遺伝子群の遺伝子診断に極めて有用であることが示されている。この成果を用いて、眼科領域においても臨床応用可能なパネルの設計を行った。これを利用して、臨床現場において、さまざまな眼先天異常患児に対し、遺伝学的検索を進め、病態の解明に寄与することを目的とした。

B. 研究方法

- 1) 眼先天異常の遺伝子変異解析パネルの設計
各種の遺伝子・遺伝性疾患のデータベース

GeneCards(<http://www.genecards.org/>)を利用して、眼の異常のある疾患名一原因遺伝子対について網羅的なリストの作成を行った。GeneCardsはOMIM, SWISS-PROT, Genatlas, GeneTests, GAD, GDPInfo, bioalma, Leiden, Atlas, BCGD, TGDB, HGMDなどの遺伝子データベースを統合したデータベースである。

2013年3月のGeneCardsデータベースによれば6237の遺伝子が、疾患と関与する遺伝子“disease genes”として登録されている、このうちもっとも権威ある遺伝性疾患データベースであるOMIM (<http://www.omim.org/>)に掲載されていて、かつeyeというキーワード合致する遺伝子名に絞り込みを行うと、857遺伝子が得られた。

さらに米国保健研究所・OMIMが維持している国際表記遺伝子名と疾患名のリストのファイルmim2gene.txtを利用して、眼科疾患関連遺伝子名と疾患名の対照表を作成した。2つのファイル共通keyを遺伝子名とし、Unix/Linuxの標準コマンドjoinを用いて共通keyで結合した。

2) 眼先天異常に対する遺伝子診断と病態解明
慶應義塾大学臨床遺伝学センターおよび国立成育医療研究センターに精査加療目的で受診した眼先天異常患児に対し、眼科的精査・治療を行うとともに、全身検索、家族歴を聴取し、遺伝要因につき解析した。また病態解明のため、光干渉断層計(optical coherence tomography: OCT)、全視野および黄斑局所網膜電図(electroretinogram: ERG)を

新たに導入して精密な形態・機能解析を行った。対象疾患は両眼性の小角膜・小眼球症、先天白内障、先天緑内障、先天無虹彩、網脈絡膜コロボーマ、種々の網膜ジストロフィー、網膜硝子体変性、視神経乳頭異常などの眼先天異常70例である。

(倫理面への配慮)

遺伝子変異解析はヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針を遵守して実施された。随時、慶應義塾大学臨床遺伝学センター・国立成育医療研究センター遺伝診療科において遺伝カウンセリングを提供した。眼科所見については、患者家族に十分な説明を行い、書面にて検査結果の二次利用について同意を得た。診療録の調査や選択された症例の解析にあたっては、匿名化し、個人が特定できないように配慮した。

C. 研究結果

1) 眼先天異常の遺伝子変異解析パネルの設計方法に示した順に解析を進め、857 遺伝子・1130 疾患の眼科疾患関連遺伝子名と疾患名の対照表を作成した。

2) 眼先天異常に対する遺伝子診断と病態解明
全身疾患を高頻度に合併する両眼性の小角膜・小眼球・先天白内障など前眼部の眼先天異常患児、視神経乳頭の先天異常、網膜硝子体変性症などに対し、解析パネルの運用を進めている。また2013年度内に新たに小眼球症や先天無虹彩、視神経低形成、網膜硝子体変性・ジストロフィーなどの患児70例(0歳～24歳)に対し、遺伝的検索とともに全身麻酔下検査を実施して、従来の眼科学的検査・治療に加えて光干渉断層計(optical coherence tomography: OCT)、全視野および黄斑局所網膜電図(electroretinogram: ERG)を新たに導入して精密な形態・機能解析を行い、遺伝要因に関わる病態の解明を進めた。

D. 考察

眼先天異常の遺伝子変異解析パネル(857 遺伝子を標的遺伝子とした解析)を作成し、効率よく遺伝性眼疾患のスクリーニングが可能となった。また眼科疾患関連遺伝子名と疾患名の対照表は、次世代シーケンサーによるエクソーム解析において、見つかった変異の解釈にも有用であった。

現在、遺伝子検索とともに新規の機器を用いた眼病変の精密な形態・機能検査および評価を行っており、更なる病態解明につながると考えられる。

遺伝子変異解析パネルを運用して、効率的な遺伝子診断法を確立・普及させること、これに基づく病態解析・治療法の開発を推進することが今後の課題である。

E. 結論

本研究班の目的を推進するために、眼科領域において臨床応用可能な遺伝子変異解析パネルを設計した。これを用いることにより、種々の眼先天異常に対しても、効率的な遺伝子診断が可能になり、新規の形態・機能評価法の導入と併せて病態解明に寄与すると期待される。

F. 研究発表

1. 論文発表

Takenouchi T, Nishina S, Kosaki R, Torii C, Furukawa R, Takahashi T, Kosaki K. Concurrent deletion of BMP4 and OTX2 genes, two master genes in ophthalmogenesis. *Eur J Med Genet*, 56: 50-53, 2013

Yokoi T, Toriyama N, Yamane T, Nakayama Y, Nishina S, Azuma N. Development of a premacular vitreous pocket. *JAMA Ophthalmol*. 2013, 131(8): 1095-1096.

Nakayama Y, Yokoi T, Nishina S, Okuyama M, Azuma N. Electroretinography and spectral-domain optical coherence tomography detection of retinal damage in shaken baby syndrome. *J AAPOS*. 2013, 17(4): 411-413.

Morimoto N, Ogiwara H, Miyazaki O, Kitamura M, Nishina S, Nakazawa A, Maekawa T, Morota N. Gorham-Stout syndrome affecting the temporal bone with cerebrospinal fluid leakage. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol*. 2013, 77(9): 1596-1600.

Azuma N, Ito M, Yokoi T, Nakayama Y, Nishina S. Visual outcomes after early vitreous surgery for aggressive posterior retinopathy of prematurity. *JAMA Ophthalmol*. 2013, 131(10): 1309-1313

仁科幸子, 若山暁美, 三木淳司, 内海隆, 羅錦營, 林孝雄, 臼井千恵, 大月洋, 宮田学, 佐藤美保, 三村治, 木村亜紀子, 菅澤淳, 中村桂子, 不二門尚: 3D 立体映像の視聴に関する実態調査: 多施設共同研究. *日本眼科学会雑誌* 2013; 117(12): 971-982.

仁科幸子: 小児眼科手術と麻酔. *眼科手術* 2013; 26(4): 521.

仁科幸子: 小児眼科の最近の話題. *日本眼科学会雑誌* 2013; 117(5): 415-417.

伊藤里美, 仁科幸子: 就学前のロービジョンケア. *あたらしい眼科* 2013; 30(4): 431-435.

窪野玲央, 高瀬博, 横井匡, 仁科幸子, 東範行, 望月學: 免疫抑制状態の小児に生じた水痘帯状疱疹ウイルスによる壊死性網膜炎の一例. *眼科臨床紀要* 2013; 6(7): 585-588.

杉山沙織, 小川佳子, 大出尚郎, 仁科幸子, 山田昌和: 周期性内斜視術後に間欠性外斜視を呈した成人の1例. *眼科臨床紀要* 2013; 6(12): 979-982.

仁科幸子: 斜視・弱視診療と両眼視機能 最近の話題. *眼科* 2014; 56(2): 292-297.

仁科幸子: 網膜剥離術後の斜視. *眼科手術* 2014; 27(1): 83-87.

2. 学会発表

Nishina S. Retinoblastoma vs. Retinal Dysplasia. Invited speaker of the Symposium "Difficult Problems Non-Strabismus Symposium", AAPOS&SNEC joint meeting, Singapore, 2013.7

Nishina S, Yokoi T, Nakayama Y, Ui M, Tanaka M, Azuma N. Analysis of retinal

structure and function in eyes with optic nerve hypoplasia. AAPOS&SNEC joint meeting, Singapore, 2013.7

Nakayama Y, Tanaka M, Yokoi T, Nishina S, Azuma N. Structure and function of the fovea region in eyes with peripapillary staphyloma. The 8th APVRS Congress, Nagoya, Japan, 2013.12

Yokoi T, Nakayama Y, Nishina S, Azuma N. Detailed structure of optic disc pits examined by swept-source OCT. The 8th APVRS Congress, Nagoya, Japan, 2013.12

仁科幸子. 診断のポイント. 第36回日本眼科手術学会 教育セミナー “未熟児網膜症の診断と治療”, 福岡, 2013.1

仁科幸子. 小児の斜視. 第95回富山大学眼科臨床カンファレンス, 富山, 2013.1

仁科幸子. 小児眼科診療のポイント. 第3回高知県眼科女性医師の会, 高知, 2013.2

仁科幸子. 小児の斜視・弱視. 第1回ORCA, 名古屋, 2013.4

横井匡、鳥山直樹、山根敬浩、中山百合、仁科幸子、東範行. Swept-source OCTによる黄斑前硝子体ポケットの形成過程の検討. 第117回日本眼科学会総会, 東京, 2013.4

中山百合、横井匡、仁科幸子、奥山真紀子、東範行. Shaken Baby Syndromeにおける眼底出血好発部位の検討. 第117回日本眼科学会総会, 東京, 2013.4

仁科幸子. 小児の斜視. 福井県眼科医会学術講演会, 福井, 2013.5

仁科幸子、横井匡、中山百合、東範行、松岡健太郎、中澤温子. 胎生血管系遺残に網膜芽細胞腫を発症した1例. 第38回日本小児眼科学会総会, 広島, 2013.7

横井匡、中山百合、仁科幸子、東範行. 小児眼底疾患における Swept-Source OCT の有用性. 第38回日本小児眼科学会総会, 広島, 2013.7

仁科幸子. 幼小児の前眼部診療. 日本眼科医学会第66回生涯教育講座:前眼部アップデート, 東京, 2013.7

仁科幸子. 幼小児の前眼部診療. 日本眼科医

会第66回生涯教育講座:前眼部アップデート, 神戸, 2013.7

仁科幸子. 幼小児の前眼部診療. 日本眼科医学会第66回生涯教育講座:前眼部アップデート, 名古屋, 2013.8

仁科幸子. 幼小児の前眼部診療. 日本眼科医学会第66回生涯教育講座:前眼部アップデート, 福岡, 2013.8

仁科幸子. 小児眼疾患の診かた. 第2回西濃眼科ゼミナール, 大垣, 2013.9

仁科幸子. 小児斜視患者に対する ORTe の使用経験. 第67回日本臨床眼科学会ランチョンセミナー “進化を遂げた次世代の視機能検査・訓練装置～3D Visual Function Trainer-ORTe”, 横浜, 2013.11

仁科幸子. 小児の神経眼科. 第67回日本臨床眼科学会インストラクションコース “やさしい神経眼科”, 横浜, 2013.11

仁科幸子. 白内障と緑内障. 日本眼科学会専門医制度第59回講習会 プライマリ・ケア・シリーズ 55 “乳幼児の診察”, 横浜, 2013.11

仁科幸子. 斜視と弱視. 東京都眼科医会卒後研修会, 東京, 2013.11

仁科幸子. 乳幼児の前眼部診療. 平成25年度第2回滋賀県眼科医会学術集談会, 大津, 2013.12

仁科幸子. 小児白内障手術. 第37回日本眼科手術学会, 京都, 2014.1

仁科幸子. 小児の斜視手術と両眼視. 第3回神奈川県視能訓練士の会講演会, 横浜, 2014.2

仁科幸子. 乳幼児の前眼部診療. 東京都眼科医会講演会・第9回多摩眼科フォーラム, 東京, 2014.3

G. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む。)

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

厚生労働科学研究費補助金
難病・がん等の疾患分野の医療の実用化研究事業（難病関連分野）
分担研究報告書

iPS 細胞を用いた先天異常症の遺伝要因の解明のためのシステム構築

研究分担者 氏名 赤松和土 所属機関 慶應義塾大学 医学部 職名 講師

研究要旨

臨床データ・検体・次世代シーケンサー技術という研究リソースを全国規模で共有して遺伝要因の解明を目指す。研究チーム内での分担研究者の役割は疾患特異的iPS細胞の樹立と蓄積である。本年度は昨年度に引き続き3種類の先天異常の疾患iPS細胞を解析した。末梢血だけでなく不死化リンパ芽球から誘導したiPS細胞が神経疾患研究に使用できることをさらに明確に示し、当研究班内ですでに蓄積されている不死化リンパ芽球ストックがiPS細胞研究リソースとして貴重であることを示した。

A. 研究目的

本計画では中枢神経系・感覚器が発生的に頭部外胚葉という共通の由来を持ち、先天異常の発症に共通の遺伝子経路が関与する可能性が高いことに着目して、既存3コンソシアムの複合体を新たに編成の上、臨床データ・検体・次世代シーケンサー技術という研究リソースを全国規模で共有して遺伝要因の解明を目指す。研究チーム内での分担研究者の役割は疾患特異的iPS細胞の樹立と蓄積である。

B. 研究方法

1. H25 年度は、昨年度に引き続き、以下の先天異常疾患に関して iPS 細胞の作成・解析が継続した。

1. CHARGE 症候群
2. 先天性ミエリン形成不全
3. シェーグレンラールソン症候群

2. 協力患者の拡大を図るために、侵襲の少ない末梢血を用いた方法の最適化を昨年度に引き続き行った。

①末梢血からの iPS 細胞の樹立と神経分化
健康成人から末梢血を採取し、CD3陽性のT細胞を純化し、センダイウイルスを用いて遺伝子導入を行いiPS細胞を樹立した。樹立したT細胞由来のiPS細胞を神経分化誘導を行い、疾患解析に用いることが可能かを検討した。

②不死化リンパ芽球株からの iPS 細胞の樹立と神経分化

健康成人からEBVを用いて作成した不死化リンパ芽球株に遺伝子導入を行いiPS細胞を樹立した。樹立したT細胞由来のiPS細胞を神経分化誘導を行い、疾患解析に用いることが可能かを検討した。

（倫理面への配慮）

動物の飼育・管理は慶應義塾大学医学部動物実験ガイドラインを遵守して行われている。また、当研究室におけるヒトES細胞の使用については、文部科学省の「ヒトES細胞の樹立及び使用に関する指針」に基づき、平成19年10月31日に「ヒト胚性幹細胞を用いた中枢神経系の再生医学の基礎的研究」として承認され、研究計画はそれに準拠したものとなっている。患者からのiPS細胞の樹立は「神経疾患患者からのiPS細胞の樹立とそれを用いた疾患解析に関する研究」として慶應義塾大学医学部倫理委員会の承認を受けており（2008年6月）、十分な説明の上で患者の同意の下で行われる。他施設との共同研究においては当該施設においても倫理委員会の承認を受けている。

C. 研究結果

1. CHARGE 症候群

CHARGE 症候群は胎児期の神経堤細胞の移動の異常によって起きることが示唆されている。今回2症例のCHARGE患者から樹立したiPS細胞から神経堤細胞を誘導し、昨年度と異なる方法でも患者由来神経堤細胞が対照細胞と比べて遊走能の異常を示すことを明らかにした。

2. 先天性ミエリン形成不全

オリゴデンドロサイトは脱髄疾患の研究には必須の細胞であるが、これまでヒト多能性幹細胞からのオリゴデンドロサイトを安定して誘導することは極めて難しかった。本年度は昨年度に引き続き先天性ミエリン形成不全(PMD)患者から作成したiPS細胞から胚葉体を解する方法で約90日でCNPase陽性の成熟オリゴデンドロサイトを誘導し、細胞死の増加・ミエリン形成の

不全を患者由来細胞を用いて in vitro で再現することに成功した。

3. シェーグレンラッソン症候群

脱髄と魚鱗癬を特徴とする先天性疾患である。1症例から iPS 細胞を樹立した。患者細胞からオリゴデンドロサイトへの分化誘導と皮膚のケラチノサイトへの分化誘導を行った。分化誘導細胞で脂質代謝の差違を詳細に検証している。

4. 末梢血由来 iPS 細胞の神経分化

T 細胞から誘導した iPS 細胞は良好に神経分化誘導が可能であり、従来の線維芽細胞由来の細胞と同様に神経疾患の病態解析に使用可能と考えられる。本年度は誘導した神経細胞における電気生理学的活動が存在することを確認した。

5. 不死化リンパ芽球由来 iPS 細胞の神経分化

昨年度よりも症例数を増やして解析を行ったが、不死化リンパ芽球から誘導した全ての iPS 細胞が良好に神経分化誘導が可能であり、これまでの解析では EBV による不死化の影響は分化細胞では従来の（不死化していない）血液細胞由来の iPS 細胞と比較して有意な差を認めていない。本年度はさらに神経変性疾患において従来の線維芽細胞・血液細胞由来の細胞と同様に病態を再現することに成功した。現在当研究班内でストックされている不死化リンパ芽球ストックは数多く保有されており、それら全てが iPS 細胞研究リソースとして用いることができるという重要な結果である。

D. 考察

先天異常を示す疾患 iPS 細胞（CHARGE 症候群・先天性ミエリン形成不全・シェーグレンラッソン症候群）を作成し、CHARGE 症候群・先天性ミエリン異常病態では関連する表現型を生体外で再現することに成功した。シェーグレンラッソン症候群に関しては現在解析中である。また、積極的に理研 BRC への細胞の寄託を進めていく。

末梢血から作製した iPS 細胞は、T 細胞由来だけでなく、不死化リンパ芽球由来線維芽細胞由来の iPS 細胞も、従来の線維芽細胞由来 iPS 細胞とほぼ同様の分化誘導能力を示し、神経変性疾患の病態を再現できることを確認した。従ってこれらの細胞は十分に疾患解析に用いることができるのではないかと考えられる。

今後は、血液細胞からの iPS 細胞を標準として患者協力を募っていく。受診のタイミングが合わない場合、樹立施設との連携が困難な受診施設では、

不死化リンパ芽球化 (SRL に依頼可能) を行い、ストックしておくことべきだと考えられる。

E. 結論

先天異常を示す疾患 iPS 細胞を作成し、いくつかの疾患では iPS 細胞から誘導した細胞が患者と同じ表現型を持つことを示した。また、末梢血由来の細胞からの iPS 細胞は線維芽細胞と似た性質を持つことが確認され、検体採取に末梢血を用いることにより、研究協力を得やすいのではないかと考えられた。また、患者血液の不死化リンパ芽球化を予め行うことにより、樹立施設へ即時検体が運搬することが難しい施設でも研究参加が可能であると考えられた。さらに、当研究班内ですでに蓄積されている不死化リンパ芽球ストックが iPS 細胞研究リソースとして用いることができると考えられる。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Higurashi N, Uchida T, Christoph L, Misumi Y, Okada Y, **Akamatsu W**, Imaizumi Y, Zhang B, Nabeshima K, Mori M, Katsurabayashi S, Shirasaka S, Okano H and Hirose S: A human Dravet syndrome model from patient induced pluripotent stem cells. Mol Brain 6:19. 2013
- 2) Kim C, Kim W, Lee H, Ji E, Choe YJ, Martindale JL, **Akamatsu W**, Okano H, Kim HS, Nam SW, Gorospe M, Lee EK: The RNA binding protein, HuD regulates autophagosome formation in pancreatic β cells by promoting autophagy-related gene 5 expression. J Biol Chem. 289: 112-121. 2014
- 3) Bundo M, Toyoshima M, Ueda J, Nemoto-Miyake T, Sunaga F, Toritsuka M, Ikawa D, Kakita A, Okada Y, **Akamatsu W**, Kato M, Okano H, Kasai K, Kishimoto T, Nawa H, Yoshikawa T, Kato T, Iwamoto K: Increased L1 Retrotransposition in the neuronal genome in Schizophrenia. Neuron 81: 306-313. 2014
- 4) DeBoer E, Azevedo R, Vega T, Brodtkin J, **Akamatsu W**, Okano H, Wagner G, Rasin MR. Prenatal deletion of the RNA binding protein HuD disrupts postnatal cortical circuit maturation and behavior. J Neurosci. (in press)

2. 学会発表

- 1) 赤松 和土：特別講演：iPS細胞技術の神経疾患研究・治療への応用 第116回日本小児科学会学術集会2013年4月19日 広島
- 2) 赤松 和土：招待講演：題名未定 第11回横浜小児先端医療セミナー 2013年5月24日(予定) 横浜
- 3) 赤松 和土：招待講演：iPS細胞技術を用いた神経系の再生医療と疾患解析 第2回小児泌尿器科研究会 2013年6月1日 東京
- 4) 赤松 和土：招待講演：iPS細胞を使った神経疾患の治療法の開発：第20回東京血管疾患研究所セミナー 2013年6月8日(予定) 東京
- 5) 赤松 和土：シンポジウム 疾患iPS細胞と創薬：神経疾患患者由来細胞からの神経系細胞の誘導と病態解析：炎症再生学会 2013年7月2日(予定) 京都
- 6) 赤松 和土：シンポジウム：「iPS technology-based regenerative medicine for damaged central nervous system」第11回遺伝子治療学会シンポジウム 遺伝子治療学会 2013年7月6日 岡山
- 7) 赤松 和土：「iPS細胞技術を用いた神経疾患研究と治療」第37回日本血液事業学会総会シンポジウム 2013年10月21日 札幌

G. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む。）

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

厚生労働科学研究費補助金
難病・がん等の疾患分野の医療の実用化研究事業（難病関連分野）
分担研究報告書

先天性疾患における非同義置換のメダカモデルを用いた解析

研究分担者 氏名 谷口善仁 所属機関 慶應義塾大学 職名 講師

研究要旨

次世代シーケンサーによるゲノム解析により、多数の非同義アミノ酸置換が同定された。本研究では、脊椎動物モデルとして近年注目を浴びているメダカ (*Oryzias latipes*) を用いて、変異を解析するための基盤作製を進めた。

A. 研究目的

メダカは小型で胚発生時は透明であるので、臓器の観察が容易である。メダカは、遺伝子改変可能で体外発生するため、非同義置換の意義を検証するのに有用な脊椎動物モデルである。本研究では、ランダムミュータジェネシスを行った変異メダカの全ゲノムシーケンスを行い、ヒト疾患解明の理解に資する有用なメダカモデルを作ることを目的とした。

B. 研究方法

がん抑制遺伝子であるp53遺伝子を欠損したメダカは谷口らにより作製された (Taniguchi, et al. *Genome Biol.*, 2006)。p53欠損メダカは、ホモ化した状態で慶大医学部予防医学校舎内に設置した閉鎖系循環飼育システム (イワキポンプ社) で維持管理した。戻し交配を行っていない個体、すなわち、ミュータジェネシスを行ったG0世代の次の世代であるF1世代のゲノムは、凍結して-20℃で保存した。これを解凍し、次世代シーケンサー-GAIIX (イルミナ社) で全ゲノムシーケンスを行った。病理切片作製とそお解析は、北里大学医学部解剖学教室の協力を得て行った。

C. 研究結果

p53 遺伝子はゲノム維持に関わる重要ながん抑制遺伝子であり、これを欠損したメダカでは自然発がんにより、生後1年以内に個体は死亡する。作製時のF2世代の個体は、腎臓や網膜、肝臓、リンパ系など、諸臓器に腫瘍が発生することが明らかとなった (Taniguchi, et al. *Genome Biol.*, 2006)。しかし、p53 欠損個体を野生型個体に戻し交配し、

ゲノム上にランダムに導入されたp53 遺伝子以外の点変異を正常型アレルに置換していくと、10回野生型に戻し交配したF10世代ではそれらの腫瘍形成が見られなくなった。戻し交配後のp53 欠損個体は外表から明らかな腫瘍は観察されないものの、野生型に比べて明らかに短命であったので、連続病理組織切片を作製して体内の様子を観察した。その結果、主として腹腔内に浸潤性の腫瘍を認めた。

メダカの組織抗原に交差する抗体がないために原発組織を特定するに至らなかった。戻し交配により明らかに腫瘍発生スペクトラムに変化が生じたので、その遺伝的背景を調べるために、F2世代のゲノムを次世代シーケンサー-GAIIX (イルミナ社) で全ゲノムシーケンスを行った。

D. 考察

TILLIG 変異メダカライブラリーに登録されているメダカは、一個体あたり2,000から3,000個の点変異が導入されていると考えられる。次世代シーケンスにより十分な厚みを持ったデータが得られたので、それを参照ゲノムに貼り付けた。ヒトやマウスの解析プラットフォームはユーザーが多く簡便に使用できるようになっているが、メダカの場合はカスタマイズが必要でさらなる解析が必要である。今後は、非同義置換を起こしたがん関連遺伝子を中心に、戻し交配前後の表現型の違いの原因となる点変異を絞り込んでいく。

E. 結論

ヒトの疾患で認められる非同義置換の機能的評価としてメダカは有用である。TILLIG法により作製した変異体は、次世代シーケンサーによる点変

異の同定が今後も加速すると思われる。また、近年報告されたTALENやCRISPR/cas9といったゲノム編集技術により、簡便にアミノ酸変異のin vivoでの機能解析が可能になるものと思われる。

F. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

Taniguchi Y, Yoshioka N. (ポスター) Genetic disease model by TILLING medaka. CSH-Asia Conference - Fishing for Answers: Zebrafish Models of Human Development & Disease、蘇州、2012年5月

G. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む。）

1. 特許取得 なし

2. 実用新案登録 なし

3. その他 なし

[IV]

資料

英国 NHS・UKGTN における検査適応基準

【疾患名】 ベックウィズウィードマン症候群 (BWS 130650)

【遺伝子名】 H19, imprinted maternally expressed transcript-*H19* (103280)
 insulin-like-growth factor 2(somatomedin A) -*IGF2* (147470)
 cyclin-dependent kinase inhibitor 1C (p57,Kip2) -*CDKN1C* (600856)
 cyclin kinase overlapping transcript 1 -*KCNQ1OT1* (604115)

【患者名】	【患者生年月日】
【患者コード】	【NHS 番号】
【申請医氏名】	
【職名】	
【検査施設 ID】	

【申請医資格】 以下のいずれかを満たすものでなければならない。	
	下記にチェックを記載
臨床遺伝専門医	
小児科専門医	
胎児診療専門医・産科専門医	

【遺伝子解析するにあたり最低限満たさなければならない診断基準】	
診断基準項目	チェック記入欄
1. BWS 診断基準	
大基準 2項目以上	
出生前からの過成長	
耳垂の線状溝・耳輪後縁の小窩	
巨舌	
腹壁欠損	
片側肥大	
胎児性腫瘍	
腎尿路奇形	
小基準 1項目以上	
羊水過多	
新生児期低血糖	
顔面の火焰状母斑	
心奇形	
特異顔貌	
または、胎児期臍帯ヘルニアの有無	

対象が診断基準を満たさなかった場合もしくは申請医の資格が上記3つに当てはまらない場合にも検査が実行されるべきと感じる場合には、検査の実行について検査実施施設に問い合わせしてください。

NHS Gene Dossier における遺伝学的検査評価のための申請書

検査－疾患－対象者

<p>疾患－疾患名と概要 (もしリストに加えない別名があれば提供してください) (A)－検査の基準</p>	<ul style="list-style-type: none"> ・ Beckwith Wiedemann Syndrome (BWS) ・ 胎児期に診断された臍帯ヘルニア <p>ベックウィズ・ヴィーデマン症候群は、胎児期の過成長・腹壁欠損・巨舌を特徴としている。他の特徴としては、耳垂の線状溝・耳輪後縁の小窩、腹腔内臓器腫大、片側肥大、新生児期低血糖、腎臓の異常、胎児性腫瘍（とくにウィルムス腫瘍）が含まれる。</p>
<p>疾患の OMIM 番号</p>	<ul style="list-style-type: none"> ・ BWS- OMIM 130650
<p>遺伝子－遺伝子名と概要 (もしリストに加えない別名があれば提供してください)</p>	<p><i>H19</i> (ASM1) <i>IGF2</i> (somatamedin A) <i>CDKN1C</i> (p57; KIP2) <i>LIT1</i> (KCNQ10T1)</p>
<p>遺伝子の OMIM 番号</p>	<p><i>H19</i> - 103280 <i>IGF2</i> - 147470 <i>CDKN1C</i> - 600856 <i>LIT1</i> - 604115</p>
<p>変異スペクトル (どの検査を行うか)</p>	<ul style="list-style-type: none"> ・ <i>LIT1</i> 遺伝子の脱メチル化 (<i>LIT1</i> 遺伝子内の KvDMR1) ・ <i>H19</i> 遺伝子の高メチル化 ・ 父親由来 11p15 領域の重複 ・ 11p15 領域の父由来片親性ダイソミー ・ 母由来の <i>H19</i> 遺伝子 DMR 領域の微小欠失 ・ 母由来 KvDMR1 の微小欠失
<p>技術的な方法</p>	<ol style="list-style-type: none"> 1. メチル化特異的多重ライゲーション依存的プローブ増幅 (MS-MLPA 法) 2. MS-MLPA 法によって同定された陽性例において、片親性ダイソミーと確定するための 11p15 マイクロサテライト分析 3. MS-MLPA 法の裏付けとして、高解像度のメチル化特異的融解分析
<p>妥当性検証のプロセス 注：自施設において、どのようにこの検査の妥当性を検証したか説明してください</p>	<p>ブラインド化 (盲検化) した 51 サンプル (24 人の健康者と 27 人の罹患者) を 1 つの「テストセット」として、この分析方法 (アッセイ) の妥当性を検証した。全てのサンプルは正確に同定された (Scott et al 2008, 添付資料参照)。</p> <p>解析は、健康コントロールが合計 200 人含まれるまで行い、いまだ偽陽性となる結果は認めなかった。この妥当性検証はサットン・がん研究所の Rahman 教授のラボにおいて実行された。</p>

	<p>単一実験において、MS-MLPA 法は、過成長や成長の遅れがある場合に認識される 11p15 領域のエピジェネティックな変化やコピー数異常を全て検出するのに有効であると、この解析は示していた。その領域における現存のメチル化アッセイとは違って、このアッセイは単離されたメチル化欠失から遺伝性のコピー数異常を区別する。加えて、MS-MLPA 法をファーストラインのアッセイとして使用することは、マイクロサテライト分析の必要性を少数の UPD 例に限定する。</p> <p>したがって、現存する診断的検査のアプローチ方法を比較すると、このアプローチ方法 (MS-MLPA 法) は検出できる 11p15 異常の範囲を広げ、この領域の分析の複雑さとコストを軽減する。</p>
<p>この検査をすでに提供していますか？もし提供しているならば、いくつか報告書を作成しましたか？すでに報告した陽性例・陰性例の数を教えて下さい。</p>	<p>いいえ</p>
<p>このサービスをどのくらいの間提供していますか？</p>	<p>まだ適用していない</p>
<p>この疾患に特化した臨床的／研究的な専門知識がありますか？</p>	<p><input checked="" type="checkbox"/>はい / <input type="checkbox"/>いいえ 詳細を提供してください。 Rahman 教授に臨床的および研究的専門知識の両方があり、聖ジョージの名誉顧問でもある。がん研究所付近にある彼の研究グループ (子どもの過成長研究, the Childhood Overgrowth (COG) study) は 11p15 領域の MS-MPLA 法を最適化した。</p>
<p>今回のものと関連している他の遺伝子や疾患について検査していますか？詳細を教えてください。</p>	<p>南ウェールズのテムズ川地域の分子遺伝学的診断のラボが現在ソトス症候群や他の過成長症例の <i>NSD1</i> 遺伝子検査を提供している。加えて、COG 研究グループは新規の過成長遺伝子と表現型との関連を同定しようと試みている。ヒトの過成長に有意に関与する新規遺伝子の検査も将来的に聖ジョージのラボにおいて提供されるだろうと予想される。</p>
<p>自施設の活動 あなたのラボでは年間何件くらいの検査を提供しますか (提供するつもりですか)。</p>	<p>約 100 件</p>

<p>経験も基づいて、何件くらいの検査が全国で必要とされますか？ どの情報に基づいているかも明記してください。</p>	<p>約 200 件。異なる技術により、これらの健康状態に対して提供される検査実施件数に、この情報は基づいている。</p>
---	---

疫学

<p>【UK での有病率】</p>	<p>BWS : 13,700 に 1 人 (Thorburn et al 1970) 11p15 異常 80% に認められる (Elliott et al 1994) 臍ヘルニア : 10000 人に対して 2.5 人 (Calzolari et al 1995), 11p15 異常は 10-20% (Heider et al 2004, Fratelli et al 2007) その他の表現型 : 11p15 異常例では BWS の臨床症状を一部認めるが診断基準を満たさない例もある。これらの表現型の頻度は明らかではないが、5,000-20,000 人に 1 人程度と考えられている。</p>
<p>【遺伝子変異の頻度】 保因者やアレル頻度</p>	<p>一般人口を母集団としたデータはないが疾患に基づいた研究のデータによると、11p15 異常は 10,000-20,000 人に 1 人の頻度と考えられる。</p>
<p>【浸透率】</p>	<p>ここ 10-15 年間に 11q15 異常と過成長の関係を調べた結果は 100% の浸透率であった。</p>
<p>【標的集団】 規定された臨床的・家族歴を満たすものを標的集団とする</p>	<p>1. BWS の診断基準を満たすもの 2 項目以上の大項目かつ、1 項目以上の小項目を満たす ◆ 大項目 : 胎児期の過成長、耳介線状溝・耳輪後縁の小窩、腹壁欠損、片側肥大、胎児性腫瘍、腎尿路奇形 ◆ 小項目 : 羊水過多、新生児期低血糖、顔面の火焰状母斑、心奇形、特異顔貌 2. 11p15 異常があり、臨床的には疑われるが BWS の診断基準を満たさない場合 3. 胎児期に臍帯ヘルニアが診断された場合</p>
<p>【標的集団における有病率】</p>	<p>一般の有病率の欄を参照。</p>

それぞれ何のデータに基づいているかの確認が必要。